

Uloga varijanti gena za IL-6, IL-10 i TNF-alfa u pojavnosti prijevremenog poroda

Plečko, Deni

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:824361>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Deni Plečko

ULOGA VARIJANTI GENA ZA IL-6, IL-10
I TNF-ALFA U POJAVNOSTI
PRIJEVREMENOG PORODA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Deni Plečko

ULOGA VARIJANTI GENA ZA IL-6, IL-10
I TNF-ALFA U POJAVNOSTI
PRIJEVREMENOG PORODA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren na: Medicinski fakultet Osijek, Laboratorij za medicinsku genetiku

Mentor rada: prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 44 stranice, 9 tablica i 4 slike.

Zahvale

Veliku zahvalnost izražavam mentorici prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na predloženoj temi, pruženoj prilici za suradnju, potpori i strpljenju pri izradi rada. Njezino stručno vodstvo škola mi je za sve nadolazeće izazove u životu.

Uz mentoricu, veliko hvala i dr. sc. Mirti Kadivnik na pomoći pri pisanju rada i konstruktivnim kritikama pri izradi istoga.

Također, zahvaljujem tehničarki Neni Arvaj pri pomoći u izvedbi laboratorijskog dijela rada. Bila je od velike pomoći i imala je odgovor na svako pitanje i nedoumicu na koju sam naišao pri obradi uzoraka.

Za pomoć pri statističkoj obradi podataka tu je bila profesorica Kristina Kralik. Za to sam joj uvelike zahvalan.

Naposlijetku, hvala mojim roditeljima, obitelji i prijateljima koji su uvijek bili tu za mene i pružali mi podršku kada je to bilo najpotrebnije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Patogeneza prijevremenog poroda.....	2
1.2. Genetička podloga prijevremenog poroda.....	3
1.3. Uloga citokina.....	4
1.4. Interleukin-10 (IL-10).....	5
1.4.1.IL-10 (rs1800896; SNP -1082 A>G).....	5
1.5. Interleukin-6 (IL-6).....	6
1.5.1.IL-6 (rs1800796; SNP -572 C>G).....	6
1.6. TNF-alfa	7
1.6.1.TNF-alfa (rs1800629; SNP -308 G>A).....	7
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Materijali.....	10
4.3. Metode	10
4.3.1.Izolacija DNA.....	11
4.3.2.Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	14
4.3.2.1.Priprema reagensa za PCR u stvarnom vremenu	14
4.3.2.2.Analiza na uređaju Applied Biosystems 7500	15
4.4. Statističke metode.....	18
5. REZULTATI	19
6. RASPRAVA	26
7. ZAKLJUČAK	31
8. SAŽETAK	32
9. SUMMARY	34
10. LITERATURA	36
11. ŽIVOTOPIS	44

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

CB	Cervikalni bris
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (<i>engl. Deoxyribonucleic Acid</i>)
dsDNA	Dvolančana deoksiribonukleinska kiselina (<i>engl. Double Stranded Deoxyribonucleic Acid</i>)
GWAS	cjelogenomska analiza povezanosti (<i>engl. Genome-Wide-Association Studies</i>)
HIV-1	Humani virus imunodeficijencije tip 1 (<i>engl. Human Immunodeficiency Virus type 1</i>)
HLA-0	Humani leukocitni antigen tip 0 (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type 0</i>)
HLA-A	Humani leukocitni antigen tip A (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type A</i>)
HLA-B	Humani leukocitni antigen tip B (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type B</i>)
HLA-E	Humani leukocitni antigen tip E (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type E</i>)
HLA-F	Humani leukocitni antigen tip F (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type F</i>)
HLA-G	Humani leukocitni antigen tip G (<i>engl. Human Leukocyte Antigen Type G</i>)
IFN-BETA 2	Interferon beta 2
IL-1	Interleukin 1
IL-1-BETA	Interleukin 1 beta
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-2	Interleukin 2
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MBG	Vezač za manji utor (<i>engl. Minor Groove Binder</i>)
MHC	Glavni kompleks histokompatibilnosti (<i>engl. Major Histocompatibility Complex</i>)
NFQ	Nefluorescentni prigušivač (<i>engl. Nonfluorescent Quencher</i>)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i>)

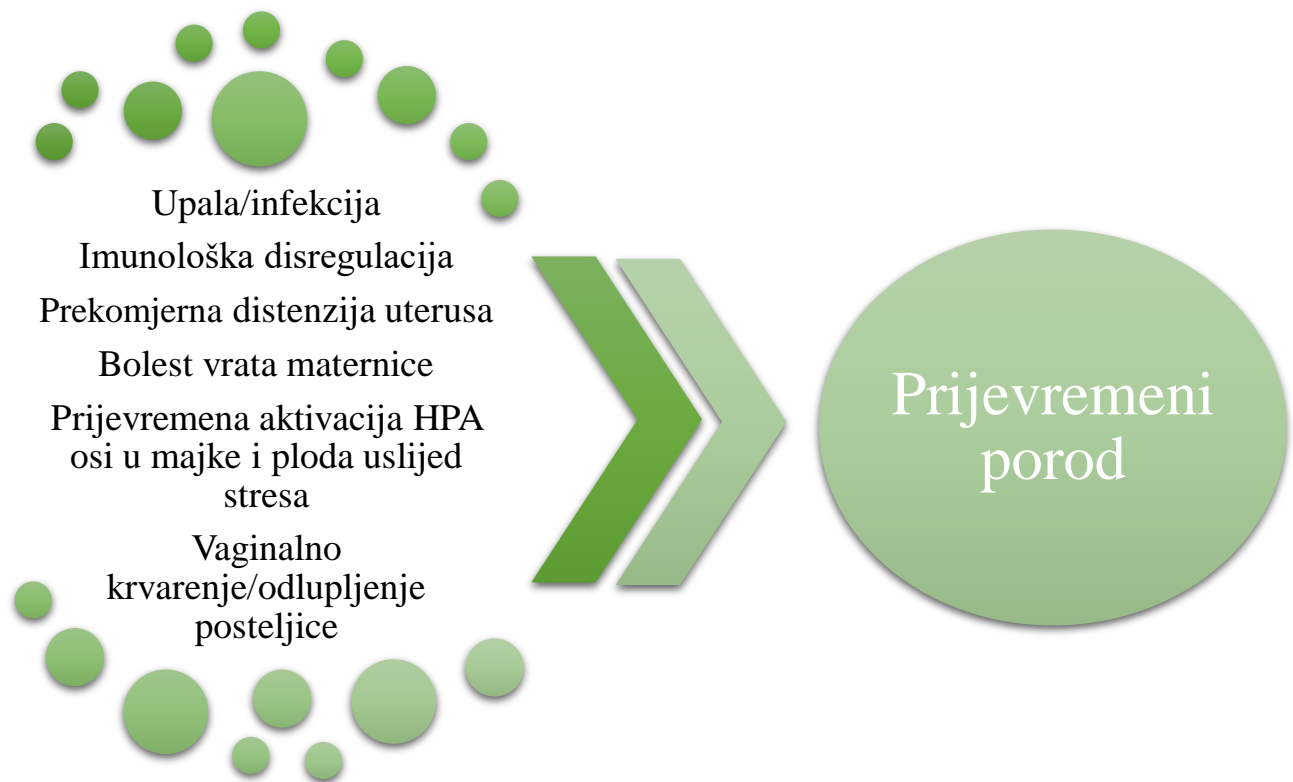
PPROM	Prerano prijevremeno prsnuće plodovih ovoja (<i>engl. Preterm Premature Rupture Of The Membranes</i>)
RNA	Ribonukleinska kiselina (<i>engl. Ribonucleic Acid</i>)
RLN2	Relaksin 2
RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (<i>engl. Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida (<i>engl. Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, <i>engl. World Health Organization</i>)
TLR4	Toll like receptor 4 (<i>engl. Toll Like Receptor 4</i>)
TNF-alfa	Tumor nekrotizirajući faktor alfa (<i>engl. Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)

1. UVOD

Prijevreteni porod Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, *engl. World Health Organisation*) definira kao porod prije 37. tjedna trudnoće (1). Prijevremeni porod predstavlja jedan od najznačajnijih javnozdravstvenih problema u perinatalnoj medicini. Udio prijevremenih poroda u odnosu na sve porode je 5 % u Europi (2). Pretpostavlja se da se godišnje rodi 15 milijuna djece diljem svijeta prijevremeno, a milijun od te djece umre uslijed prijevremenog porođaja (3). Unazad 15 godina u Hrvatskoj se bilježi blagi porast stope incidencije prijevremenih poroda. Navedeni porast incidencije prijevremenih poroda može se objasniti sve češćim medicinski induciranim prijevremenim porodima. Uzročnik je neonatalnog mortaliteta u 70 %, a morbiditeta u 75 % slučajeva (2). Prijevremeni porod možemo podijeliti: ovisno o gestacijskom tjednu u kojemu se dogodi: kasni prijevremeni porod (od 33. do 37. (33 – 36 + 6) gestacijskog tjedna), rani prijevremeni porod (od 28. do 32. (28 – 31 + 6) gestacijskog tjedna) te ekstremno rani prijevremeni porod (od 22. do 27. gestacijskog tjedna)(1); ovisno o načinu nastanka: medicinski inducirani prijevremeni porod te spontani prijevremeni porod (2). 2/3 spontanih prijevremenih poroda, sa ili bez prijevremenog pucanja plodovih ovoja, nastupa iz neobjašnjivih razloga. Patogeneza prijevremenog poroda i dalje nije do kraja objašnjena, no poznato je kako su višestruki rizični čimbenici kod majke povezani s povećanom incidencijom. Dokazano je kako žene crne rase dvostruko češće imaju preuranjeni porod naspram žena bijele rase (4). Utvrđeni rizični čimbenici su dob majke, kratak period između dvije trudnoće, višeplodna trudnoća, maternične ili cervikalne anomalije, potpomognuta oplodnja, gestacijsko krvarenje, abnormalna placentacija, urogenitalna infekcija, zlouporaba sredstava ovisnosti, pušenje, bakterijske vaginoze, loš porast težine u trudnoći, parodontna bolest. Unatoč uložnim naporima za umanjivanje navedenih faktora rizika provedbom raznih intervencijskih mjera za sprječavanje ili liječenje prijevremenih poroda poput nadopune prehrane, liječenje bakterijske vaginoze, odmaranja, kućne njege, utvrđeno je kako su od male ili nikakve koristi. Otkriveno je kako davanje progesterona sredinom trudnoće trudnicama koje su ranije imale prijevremeni porod ili imaju kratak grlić maternice, smanjuje rizik od prijevremenog poroda, iako taj mehanizam nije do kraja proučen i shvaćen (5).

1.1. Patogeneza prijevremenog poroda

Prijevremeni porod složen je poremećaj, odnosno zdravstveno stanje na koje utječe brojni niz faktora i međudjelovanje brojnih čimbenika rizika prikazanih na Slici 1. (5). Slika prikazuje niz poznatih čimbenika rizika uključujući genetičke, biološke, socijalne i bihevioralne te okolišne čimbenike koji utječu na višestruke molekularne mehanizme što u konačnici dovodi do aktivacije tkiva majke i fetusa, uslijed čega dolazi do otpuštanja medijatora koji stimuliraju trudove, dilataciju cerviksa te rupturu plodovih ovoja čime dolazi do preuranjenog poroda (2).



Slika 1. Prikaz faktora rizika i međudjelovanje čimbenika koji mogu utjecati na pojavu prijevremenog poroda (Izvor: izradio autor rada po uzoru na (2))

1.2. Genetička podloga prijevremenog poroda

Između 20 i 30 % preuranjenih poroda medicinski je inducirano kako bi se smanjila mogućnost materničnih ili fetalnih komplikacija, unatoč tome najčešći uzrok prijevremenog poroda su spontani trudovi ili preuranjeno puknuće plodovih ovoja (6). U zadnje vrijeme sve više istraživanja govori o genetičkoj predispoziciji preuranjenog poroda. Čak 20 do 40 % varijacija u vremenu početka poroda može se pripisati genetičkim predispozicijama (2). Biomarkeri koji mogu biti snažni prediktori preuranjenog poroda su IL-6, IL-8, TNF-alfa i relaksin. Problem koji se javlja kod tih biomarkera je što variraju tijekom vremena i među pojedincima, stoga je teško odrediti pri kojim koncentracijama je rizik od preuranjenog poroda povećan. Nasuprot tome, genetički faktori stabilni su tijekom vremena stoga mogu biti bolji prediktor rizika. Nove genetičke studije mogu identificirati markere koji točnije predviđaju povećani rizik nego dosadašnji čimbenici rizika. Prijevremeni porod treba se shvatiti kao složeni poremećaj na koji utječe brojni niz čimbenika, za razliku od monogenetskog poremećaja u kojemu mutacija jednog gena dovodi do pojave bolesti. Složeni poremećaj pod utjecajem je raznih čimbenika, od kojih ni jedan nije dovoljan da sam izazove poremećaj. Prijevremeni porod, vjerojatno ovisi o nizu međusobno povezanih čimbenika, uključujući genetičke, epigenetičke i okolišne čimbenike rizika (6). Brojna istraživanja ispitivala su utjecaj majčinih te djetetovih gena na ishod trudnoće te rezultati uvelike variraju, od 15 % do čak 40 %. Za ispitivanje varijanti gena koje bi mogle imati utjecaj na prijevremeni porod mogu se koristiti studije vezanosti gena (*engl. linkage*), analize genetičke povezanosti te cijelogenomske analize povezanosti (GWAS, *engl. genome-wide association studies*) (2). Cijelogenomske analize povezanosti korištene su kao robusna i nepristrana metoda za otkrivanje polimorfizama jednog nukleotida (SNP, *engl. single nucleotide polymorphism*) povezanih s bolešću. Ove studije, obično s ustrojem studije slučaj-kontrola (*engl. case-control*), koriste se za identifikaciju zajedničkih lokusa od interesa za složene bolesti, od kojih se mnoge mogu koristiti kao markeri osjetljivosti ili prediktori patoloških mehanizama (5 – 7). S dosadašnjim ograničenim utjecajem GWAS-a na preuranjeni porod, pozornost je usmjerena na pronalaženje rijetkih varijanti u populaciji, a ne uobičajenih koje služe kao osnova za GWAS. Razvojem visokoučinkovitih tehnologija sekvenciranja, sekvenciranje cijelog egzoma ili genoma postaje sve dostupnije i lakše za de novo varijante ili rijetke varijante (8). 2015. objavljena je studija Zhanga sa suradnicima koja je pronašla

povezanost dva SNP-a s prijevremenim porodom te 2017. GWAS istraživanje istog autora otkrilo je 14 lokusa majke povezanih s duljinom trajanja trudnoće (2).

1.3. Uloga citokina

Placenta, organ koji je u izravnom kontaktu s majčinim stanicama i majčinom krvi, važna je imunološka barijera između antigena majke i fetusa. Ovaj organ ne eksprimira glavni kompleks histokompatibilnosti (MHC, *engl. major histocompatibility complex*) klase 1, humani leukocitni antigen A (HLA-A, *engl. human leukocyte antigen*) i HLA-B te je tako zaštićen od citotoksičnih T limfocita. Kako bi se izbjeglo odumiranje tkiva izazvano prirodno-ubilačkim stanicama (NK-cells, *engl. natural killer cells*) koje prepoznaju HLA-0 stanice, stanice trofoblasta izražavaju kombinaciju nespecifičnih MHC molekula poput HLA-E, HLA-F i HLA-G. Poznato je kako je preuranjeni porod povezan s lokalnim i sistemskim promjenama ravnoteže citokina tipa 1 i tipa 2. Decidualni limfociti i mononuklearne stanice periferne krvi trudnica s povećanim rizikom od preuranjenog poroda sintetiziraju visoke razine citokina tipa 1, IL-2, IL-12 i interferona-gama. S druge strane, razine citokina tipa 2, IL-10 i IL-5, pokazuju niske razine. Cirkulirajuće razine TNF-alfa i IL-6 povišene su kod zdravih trudnica u usporedbi s zdravim ženama koje nisu trudne te su dodatno povišene u trudnica s preeklampsijom. Niz otkrića dovelo je do spoznaje da je trudnoća stanje kontrolirane blage upale, tijekom koje razine cirkulirajućih citokina, poput TNF-alfa, IL-6 i IL-1, su povišene u usporedbi s ženama koje nisu trudne. Uslijed infekcije nastaje upala što je vidljivo po povišenim razinama TLR4, IL-1, IL-6 i TNF-alfa u amnionskoj tekućini. Leukocitoza prati otpuštanje proupalnih citokina što rezultira apoptozom, preuranjenim pucanjem membrana i početkom prijevremenog poroda. Specifični geni reguliraju određene citokine, stoga polimorfizmi kod majke istraživani su kako bi se dokazala povezanost između njih i preuranjenog poroda (9). Upalna signalizacija vrlo je složen put. Vrlo bitnu ulogu u implantaciji fetusa, pripremi posteljice i ishodu trudnoće igra ravnoteža između proupalnih i protuupalnih citokina (9). Dokazano je da izmjene u koncentraciji proupalnih citokina, uglavnom IL-1-beta, TNF-alfa i interferona-lambda rezultiraju povećanom stopom preuranjenih poroda (9).

1.4. Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 protuupalni je citokin kojega uglavnom proizvode monociti te u manjoj mjeri limfociti. Ovaj citokin ima pleiotropne učinke u imunoregulaciji i upali. Poznat je, također, kao i faktor inhibicije sinteze citokina ili inhibitor faktora rasta T stanica te je poznato da snižava ekspresiju kostimulacijskih molekula u makrofagima. Poboljšava preživljenje B stanica, njihovu proliferaciju te proizvodnju antitijela. Studije na nokaut miševima ukazale su kako je ovaj citokin esencijalni imunoregulator probavnog trakta, a dokazano je da su mutacije u ovom genu povezane s povećanom osjetljivošću na HIV-1 infekciju i reumatoidni artritis (9).

1.4.1. IL-10 (rs1800896; SNP -1082 A > G)

Gen za *IL-10* sastoji se od 5 egzona, proteže se oko 5,2 kB i nalazi se na kromosomu 1, na 1q31 – 1q32.50. Dosad je otkriveno barem 49 polimorfizma za *IL-10* od kojih ih se najviše nalazi u promotorskoj regiji gena. Od polimorfizama najčešći su polimorfizmi pojedinog nukleotida, zatim mikrosateliti te jedna delecija 3 nukleotidna para (10). Gen za *IL-10* polimorfan je što rezultira različitim koncentracijama u pojedincima. Na lokaciji -1082 (rs1800896) postoji nukleotidna zamjena adenina za gvanin. Ovisno o varijanti nukleotida, varira proizvodnja interleukina-10. Naime, pojedinci s varijantom G/G imaju najvišu koncentraciju IL-10, dok s druge strane pojedinci s varijantom A/A imaju najnižu koncentraciju IL-10 u krvi. Prijevremeni porod povezan je s nedostatkom IL-10 u placenti jer A/A genotipovi imaju G1082A polimorfizam u promotorskoj regiji što rezultira značajno nižim razinama IL-10. Novija istraživanja pokazuju značajno manju učestalost genotipa G/G u žena s prijevremenim porodom (11). U višeplođnim trudnoćama nije dokazana povezanost polimorfizma i prijevremenog poroda (12). Polimorfizam -1082 A>G povezan je s pojavnošću karcinoma poput ne-sitnostaničnog karcinoma pluća, b-staničnog limfoma, karcinom vrata maternice te karcinom usne šupljine (13).

1.5. Interleukin-6 (IL-6)

Gen za *IL-6* nalazi se na 7q21 i obično je poznat kao *IL-6*, *IFN beta-2* ili rijetko kao čimbenik rasta hibridoma ili faktor stimulacije hepatocita te faktor stimulacije B-2 stanica (9). Ovaj citokin proizvodi veliki broj stanica poput T i B limfocita, stanice endotela, stanice miometrija, monociti, fibroblasti, keratinociti, adipociti te neke tumorske stanice. IL-6 uključen je u imunološku i upalnu regulaciju tijekom hematopoeze, metabolizma kostiju te embrionalnog i fetalnog razvoja kardiovaskularnog i živčanog sustava (14). IL-6 široko je izražen u ženskom reproduktivnom traktu i gestacijskom tkivu te vrši regulatorne funkcije embrija poput implantacije i razvoja placente, kao i imunološke prilagodbe potrebne za toleriranje trudnoće. U slučaju prijevremenog poroda uslijed intraamnijske infekcije, IL-6 je povišen u majčinom serumu u odnosu na trudnice s terminskim porodom. Također, prijevremeni porod povezan je i s povišen IL-6 u amnijskoj tekućini bez obzira na infekciju, iako su te razine više u žena s dokazanom infekcijom. Polimorfizam sekvenci gena za *IL-6*, mogao bi biti čimbenik koji pridonosi povećanju bioraspoloživosti citokina u pojedinim slučajevima prijevremenog poroda. Istraživanje 2003. Shimana i suradnika dokazalo je da trudnice koje su homozigotne (G/G) ili heterozigotne (G/C) na položaju -174 imaju normalnu razinu IL-6, dok trudnice homozigotne (C/C) imaju smanjenu proizvodnju IL-6 (15).

1.5.1. IL-6 (rs1800796; SNP -572 C > G)

Na lokaciji -572 (rs1800796) nalazi se polimorfizam na promotorskoj regiji gena što rezultira nuklotidnom zamjenom citozina za gvanin ovisno o varijanti gena. Ispitanici s varijantom gena G/G imaju najnižu koncentraciju IL-6 s obzirom da je smanjena aktivnost promotora (16). Istraživanje 2017. Yanga i suradnika pokazalo je kako trudnice s polimorfizmom rs1800796 imaju znatno povećan rizik za umjereni i kasni preuranjeni porod u azijskoj populaciji (17). Uz smanjenu proizvodnju IL-6, polimorfizam ima suspektan utjecaj i na pojavu endometrioze (18). Uz navedeno, polimorfizam je povezan s rizikom razvoja Alzheimereve bolesti, osteoporoze, povećanim rizikom pojave koronarne bolesti te razvojem dijabetesa tip 2 u korejske populacije (19 – 22).

1.6. TNF-alfa

Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α , *engl. Tumor necrosis factor alpha*) jedan je od najvažnijih citokina u imunološkom sustavu. TNF- α pripada velikoj obitelji citokina nazvanoj TNF superobitelj. Navedena superobitelj regulira desetak puteva povezanih sa staničnom proliferacijom, diferencijacijom, preživljavanjem i smrću. TNF- α ima temeljnu ulogu u normalnom imunološkom sustavu. Naime, on je, uz IL-1 i IL-6, jedan od tri najvažnija proupalna citokina. Regulacija TNF- α vrši se pozitivnom povratnom spregom, što u nekim slučajevima, može pojačati ekspresiju ovog citokina rezultirajući autoimunim oboljenjima. Dokazana je povezanost povećane razine TNF- α s raznim reproduktivnim bolestima poput endometrioze, infekcija, čestih spontanih pobačaja. Razina ovog citokina znatno utječe na ravnotežu između proupalnih i protuupalnih citokina što, u slučajevima disbalansa, može uzrokovati prijevremeni porod (23). TNF- α povećava proizvodnju metaloproteinaza koje razgrađuju kolagen u raznim stanicama i tkivima, uključujući fetalne membrane i cerviks maternice. Povećana proizvodnja navedenog citokina povećava proizvodnju metaloproteinaza koje razgrađuju kolagen što može dovesti do prijevremenog puknuća fetalnih ovojnica (24). Monzon - Bordonaba i suradnici 2002. godine predložili su da TNF- α djeluje kao posrednik u uspostavljanju i održavanju trudnoće te u normalnom i prijevremenom puknuću fetalnih ovojnica kroz modulaciju trofoblasta (25).

1.6.1. TNF-alfa (rs1800629; SNP -308 G > A)

Gen za *TNF- α* nalazi se na kromosomu 6p21 unutar regije MHC klase 3. Na lokaciji -308 nalazi se polimorfizam koji rezultira zamjenom gvanina za adenin (26, 27). Ovisno o varijanti gena, varira i proizvodnja ovog citokina. Ispitanici s varijantom gena G/G imaju normalnu ekspresiju citokina, dok ispitanici s varijantom A/A imaju pretjeranu ekspresiju (27). Pretpostavlja se da pojedinci s polimorfizmom -308 pretjerano reaguju na infekcije, i to s povećanom ekspresijom TNF- α , te da takve osobe imaju povećane komplikacije od infekcija kao što su sepsa, cerebralna malarija, humani papiloma virus te lišmenioza. Dosta studija pokazalo je jaku povezanost između genotipa TNF-308 i preuranjenog poroda, što sugerira da bi genski polimorfizmi za upalni odgovor mogli utjecati na duljinu trudnoće (28).

2. HIPOTEZA

Varijante gena za *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) i *TNF-alfa* (rs1800629) predstavljaju potencijalni rizični čimbenik za pojavu preuranjenog poroda.

3. CILJ

Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu ispitati povezanost tri genske varijante *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) i *TNF-alfa* (rs1800629) s pojavom spontanih prijevremenih poroda te utvrditi jesu li navedene varijante genetički rizični čimbenici.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija slučajeva i kontrola (*engl. case - control study*)

4.2. Materijali

U svrhu studije analizirano je 175 uzoraka trudnica koje su prijevremeno rodile i 169 pripadajućih kontrolnih uzoraka radi genotipizacije s ciljem određivanja varijanti gena za *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) i *TNF-alfa* (rs1800629). Kontrolni uzorci su uzorci trudnica s terminskim porodom. Svi podaci o trudnicama su šifrirani pod jedinstvenim šiframa kako ne bi došlo do otkrivanja identiteta trudnica. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, 20. ožujka 2023., KLASA: 602-04/23-08/03, UR BROJ: 2158-61-46-23-53.

4.3. Metode

Uzorci su prikupljeni u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra u Osijeku, a laboratorijska obrada provedena je u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku. Anamnestički podaci prikupljeni su u suradnji s roditeljima. Također, koristila se i dostupna medicinska dokumentacija vezana za trudnoću i porod. Uz osobnu anamnezu, prikupljena je i obiteljska anamneza kako bi se utvrdilo postoji li obiteljska povijest prijevremenih poroda.

Krv se uzorkovala u drugoj fazi poroda, nakon dobivenog informiranog pristanka. Uzorkovalo se 3 ml venske krvi majke u epruvete s podtlakom (Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, New York, Sjedinjene Američke Države) i antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina).

4. MATERIJALI I METODE

Analizirani su uzorci trudnica prikupljenih u sklopu projekta „Uloga PROGINS mutacija progesteronskih receptora u modulaciji rizika prijevremenog poroda (VIF2017-MEFOS-03)“ Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.3.1. Izolacija DNA

Izolacija DNA radila se na mini spin kolonama, DNA NucleoSpin Blood (Macherey - Nagel, Düren, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Kit se sastoji od pufera B3, BW, B5, BE i NucleoSpin Blood kolona te kiveta za prikupljanje uzoraka. Prilikom izoliranja DNA iz pune krvi, krv mora biti na 37 °C. Prije izolacije, odnosno pipetiranja krvi potrebno je Vacutainer epruvetu lagano promiješati kako bi se stanice u uzorku ravnomjerno rasporedile. Pomoću NucleoSpin Blood seta reagensa, genomska se DNA priprema iz pune krvi. Liza stanica postiže se inkubacijom pune krvi u otopini koja sadrži velike količine kaotropnih iona u prisutnosti Proteinaze K. Kaotropni ioni tvorit će hidrofobnu okolinu te u tim uvjetima silika membrana NucleoSpin kolone predstavlja mjesto vezanja DNA. Proces vezanja je specifičan za nukleinske kiseline te reverzibilan. Odgovarajući uvjeti za postizanje vezanja DNA na silika membranu odgovarajuće NucleoSpin kolone postiže se dodatkom etanola na lizat. Etanol će dehidrirati DNA te ukloniti soli zbog razlike u topljivosti. Koracima ispiranja s puferima BW i B5, uz centrifugiranje, učinkovito se ispiru nečistoće. Nakon ispiranja s navedenim puferima, potrebno je osušiti silika membranu odgovarajuće NucleoSpin Blood kolone. Sušenje membrane postiže se dodavanjem etanola na kolonu i centrifugiranjem. Nakon sušenja slijedi proces elucije čiste genomske DNA s membrane. Proces elucije vrši se u uvjetima niske ionske jakosti u blago alkalnom puferu za ispiranje, BE koji je prije upotrebe potrebno ugrijati na 70 °C. DNA je do analize čuvana u BE puferu na temperaturi od -20 °C. Ukupan volumen izolirane DNA je 100 µL (29).

Nakon izolacije, na uređaju Qubit 3 Fluorometer, prikazanim na Slici 2. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), napravljena je provjera koncentracije DNA u

4. MATERIJALI I METODE

uzorcima. Za provjeru koncentracije DNA potrebno je upaliti uređaj te odabrati potrebnu analizu, u ovom slučaju dvolančanu DNA (dsDNA, engl. *double stranded DNA*). Za analizu potrebno je pripremiti dvije kivete za standarde te onoliko kiveta koliko je uzoraka. Radna otopina priprema se otapanjem Qubit reagensa u Qubit puferu u omjeru 1 : 200. Za svaki standard i uzorak potrebno je 200 μL radne otopine. Nakon dodavanja radne otopine i uzoraka, kivete je potrebno vorteksirati 2 – 3 sekunde te ostaviti reakcijsku smjesu da se inkubira 2 minute. Prije očitavanja koncentracija uzoraka, potrebno je kalibrirati uređaj sa standardima. Nakon kalibracije uređaj je spreman za očitavanje koncentracija DNA u uzorcima. Prije analize nužno je odabrati volumen uzorka. Između uzastopnih uzoraka potrebno je pričekati par sekundi kako bi se prostor za kivetu vratio na sobnu temperaturu (30, 31).

Protokol:

Svi reagensi trebaju biti sobne temperature prije početka testa.

1. U stalak postaviti dvije tubice volumena 500 μL za standarde i po jednu za svaki uzorak.
2. Pripremiti Qubit radnu otopinu – Qubit reagens razrijediti 1 : 200 u Qubit puferu (199 μL pufera + 1 μL reagensa). Potrebno je 200 μL radne otopine za svaki standard i uzorak.
3. U tubice za standarde pipetirati 190 μL radne otopine i 10 μL standarda. U tubice za uzorke pipetirati 190 μL radne otopine i 10 μL uzorka. Svaka tubica ima ukupni volumen 200 μL .
4. Tubice vorteksirati 2 – 3 sekunde.
5. Inkubirati na sobnoj temperaturi 2 minute.
6. Pokrenuti odgovarajući test na Qubit fluorometru. Umetnuti tubicu u uređaj i očitati koncentraciju.

4. MATERIJALI I METODE



Slika 2. Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), uređaj za mjerenje koncentracije DNA, RNA i proteina u uzorcima. (Izvor: fotografirao autor rada u Laboratoriju za genetiku Medicinskog fakulteta Osijek)

Provjera koncentracije DNA provedena je prema protokolu proizvođača Thermo Fisher Scientific (31).

4. MATERIJALI I METODE

4.3.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, *engl. single nucleotide polymorphism*) ispitani su pomoću TaqMan kompleta reagensa proizvođača Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, SAD).

Tablica 1. prikazuje opis izabranih SNP-ova za *IL-10*, *IL-6* i *TNF-alfa*

Tablica 1. Karakterizacija SNP-ova za odabrane gene

SNP	Lokacija	Promjena baza	Tip zamjene
rs1800896 (<i>IL - 10</i>)	Chr.1: 206773552 na GRCh38	A/G	Supstitucija
rs1800796 (<i>IL - 6</i>)	Chr.7: 22726627 na GRCh38	C/G	Supstitucija
rs1800629 (<i>TNF-alfa</i>)	Chr.6: 31575254 na GRCh38	G/A	Supstitucija

4.3.2.1. Priprema reagensa za PCR u stvarnom vremenu

Reakcijska smjesa za PCR, prikazana u Tablici 2., priprema se u PCR radnoj stanici.

Tablica 2. Reagensi i potrebni volumeni za pripremu PCR reakcijske smjese prema uputama proizvođača

1.	TaqMan Genotyping PCR MasterMix (2X)	V (TaqMan Genotyping PCR MasterMix (2X)) = 6,25 μ L * N
2.	Voda bez nukleaza	V (H ₂ O) = 4,94 μ L * N
3.	SNP Assay 40X	V (SNP) = 0,31 μ L * N
4.	DNA izolat	V (DNA) = 1 μ L
N = broj jažica u plateu + 10 %		

U kivetu se ispipetiraju MasterMix, voda i ispitivani SNP te se ona blago vorteksira. Zatim se pripremljena reakcijska smjesa pipetira u sve jažice platea. U izabrane negativne kontrole umjesto 1 μ L uzorka stavlja se 1 μ L H₂O, a u ostatak se stavlja 1 μ L DNA izolata.

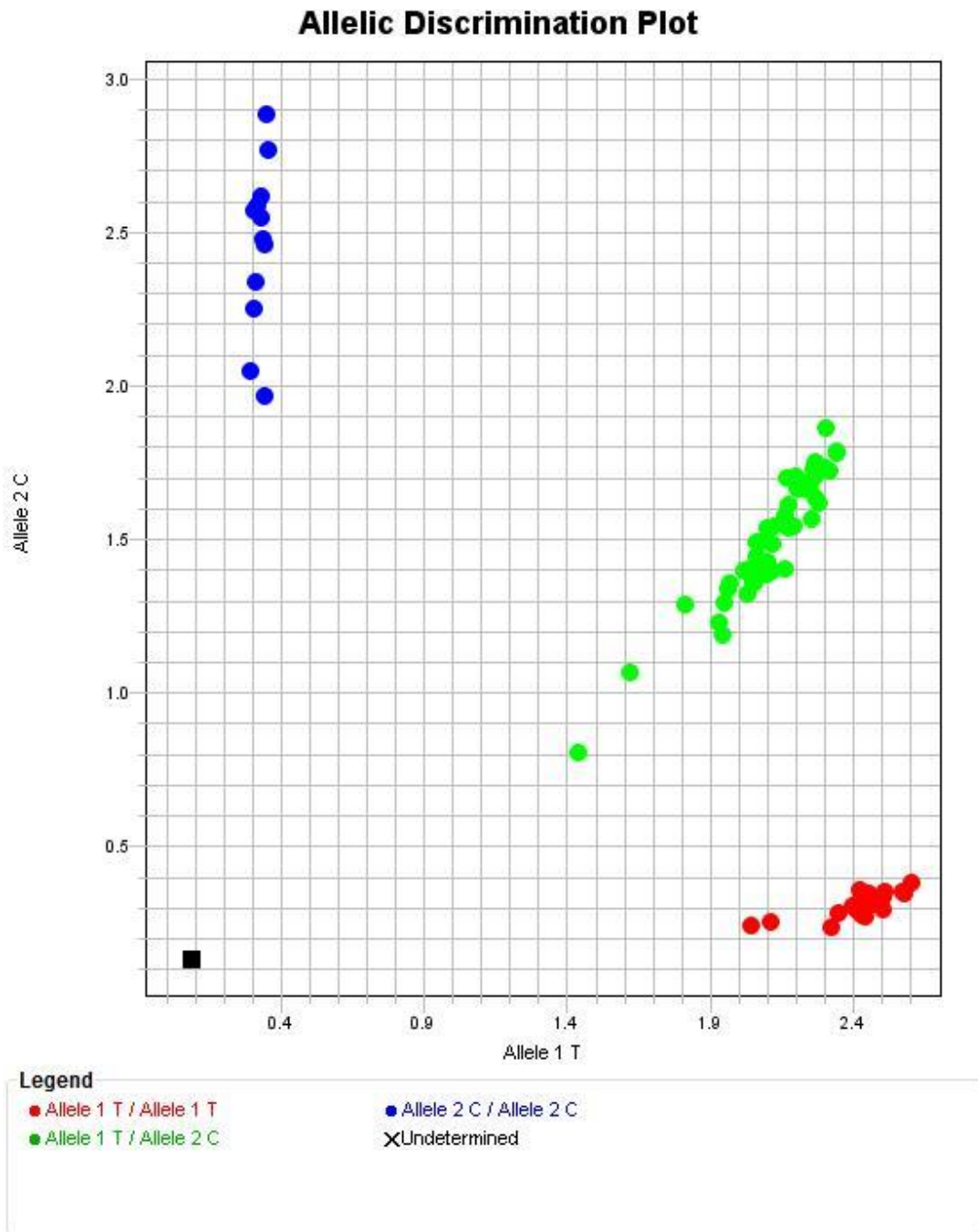
4.3.2.2. Analiza na uređaju Applied Biosystems 7500

Analiza SNP-ova izvela se na uređaju Applied Biosystems 7500 Real Time PCR (Waltham, Massachusetts, SAD), prikazanim na Slici 3., pomoću seta reagensa za genotipizaciju proizvođača Life Technologies / Applied Biosystems TaqMan SNP Genotyping Assays (Waltham, Massachusetts, SAD). Za analizu korištena su tri testa TaqMan SNP Genotyping Assays, human: C__1747360_10 (rs1800896), C__11326893_10 (rs1800796), C__7514879_10 (rs1800629). Navedeni reagensi koriste TaqMan 5' nukleaze za amplifikaciju i detekciju ciljanih polimorfizama u uzorcima DNA. Svaki test omogućuje genotipizaciju pojedinaca za određeni SNP i sastoji se od dvaju primera i dvije TaqMan MGB (*engl. minor groove binder*) probe s nefluorescentnim prigušivačima, NFQ (*engl. nonfluorescent quencher*). Jedna je sonda obilježena VIC bojom za otkrivanje sekvence alela 1, a druga je obilježena FAM bojom za otkrivanje sekvence alela 2. Za vrijeme polimerizacije, egzozukleazna aktivnost DNA polimeraze cijepa probe hibridizirane na ciljanoj sekvenci. Uslijed cijepanja, dolazi do odvajanja reporter boje te posljedično pojave fluorescencije. Ukoliko je proba komplementarna ciljanoj sekvenci i hibridizirana, dolazi do porasta fluorescencije. Rezultat genotipizacije može biti jedan od tri moguća genotipa: homozigot wt/wt, heterozigot, homozigot mt/mt (32). Rezultat genotipizacije prikazan je na Slici 4. Analiza rezultata napravljena je pomoću 7500 Real Time PCR SDS software-a v2.3 proizvođača Life Technologies (Waltham, Massachusetts, SAD).

4. MATERIJALI I METODE



Slika 2. Uređaj Applied Biosystem 7500 Real Time PCR (Waltham, Massachusetts, SAD) proizvođača Thermo Fisher Scientific (Izvor: fotografirao autor rada u Laboratoriju za genetiku Medicinskog fakulteta Osijek)



Slika 3. Grafički prikaz frekvencije alela dobiven pomoću 7500 Real Time PCR software-a v2.3 proizvođača LifeTechnologies (Waltham, Massachusetts, SAD) (Izvor: eksportirao autor rada u Laboratoriju za genetiku Medicinskog fakulteta Osijek)

4.4. Statističke metode

Kategorički podaci su predstavljeni apolutnim i relativnim frekvencijama. Razlika u kategoričkim varijablama testirala se χ^2 testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro – Wilkovim testom, a zbog razdiobe koja ne slijedi normalnu, podaci su opisani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike u kontinuiranim varijablama s obzirom na dvije nezavisne skupine testirane su Mann Whitney U testom.

Testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrija genotipskih frekvencija (Hi – kvadrat test, $df = 1$) i analiza genotipova učinjeni su online programom SNPstats (33). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha (α) = 0,05. Za analizu podataka korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 344 ispitanice, od kojih je 175 (50,9 %) s prijevremenim porodom, a 169 (49,1 %) s terminskim porodom.

Čistoća i kvaliteta izolirane DNA provjerena je na uređaju Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Mjerenje na uređaje Qubit 3 Fluorometer dalo je prosječnu koncentraciju DNA u izolatima od 44,4 (27,23 – 57) (medijan (interkvartilni raspon)) ng/μl.

Nema značajne razlike u dobi ispitanica, indeksu tjelesne mase i u broju dosadašnjih poroda s obzirom na to radi li se o terminskom ili prijevremenom porodu. Porodna masa djeteta je značajno niža kod prijevremenih poroda (Mann Whitney U test, $P < 0,001$), a značajno je i manji broj gestacijskih tjedana (Mann Whitney U test, $P < 0,001$) (Tablica 3.).

Tablica 3. Mjere sredine i raspršenja dobi, indeksa tjelesne mase, tjedana gestacije, porodne mase djeteta i dosadašnjih poroda

	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Terminski porod (n = 169)	Prijevremani porod (n = 175)	
Dob (godine)	31 (26 – 34)	30 (26 – 35)	0,59
Tjelesna visina (cm)	166 (164 – 172)	166 (163 – 170)	0,22
Tjelesna masa (kg)	77 (68 – 85)	74 (65 – 84,50)	0,09
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	27,40 (24,40 – 30,40)	26,60 (24,10 – 30,10)	0,28
Tjedni gestacije	39 + 4 (38 + 6 – 40 + 2)	35 (32 – 36 + 1)	< 0,001
Porodna masa djeteta (g)	3450 (3110 – 3780)	2430 (1790 – 2780)	< 0,001
Broj poroda	2 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0,07

*Mann Whitney U test

5. REZULTATI

S obzirom na način poroda vaginalno je dovršen porod u 286 (83,1 %) slučajeva, značajnije više u skupini s terminskim porodom, dok je carski rez značajnije u skupini ispitanica s prijevremenim porodom (χ^2 test, $P < 0,001$). U obiteljskoj anamnezi značajno je više prijevremenih poroda u skupini ispitanica s prijevremenim porodom (χ^2 test, $P < 0,001$), i u 6 (1,7 %) slučajeva radilo se o ekstra ranom, u 7 (2 %) slučaja o ranom, a o kasnom prijevremenom porodu radilo se u 22 (6,4 %) slučajeva (χ^2 test, $P < 0,001$) (Tablica 4.).

Tablica 4. Osnovna obilježja ispitanica

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terminski porod (n = 169)	Prijevremeni porod (n = 175)	Ukupno (n = 344)	
Porod				
Vaginalni	164 (97)	122 (69,7)	286 (83,1)	< 0,001
Sc	5 (3)	53 (30,3)	58 (16,9)	
Prijevremeni porodi u obiteljskoj anamnezi	0	33 (18,9)	33 (9,6)	< 0,001
Tjedan prijevremenog poroda (obiteljska anamneza)				
ekstra rano	0	6 (3,4)	6 (1,7)	
rani	0	7 (4)	7 (2)	
kasni	0	22 (12,6)	22 (6,4)	< 0,001
Ne	169 (100)	140 (80)	309 (89,8)	

* χ^2 test[†]

5. REZULTATI

Kavu konzumiraju 273 (79,4 %) ispitanice, a puši ih 97 (28,2 %). Uroinfekcija se bilježi kod 44 (12,8 %) ispitanica, a pozitivan CB kod 71 (20,6 %) ispitanice, bez značajne razlike u odnosu na porod. Ispitanice koje su imale prijevremeni porod značajnije češće imaju komplikacije (χ^2 test, $P < 0,001$), značajno češće ureaplazmu kao izoliranog uzročnika (Fisherov egzakti test, $P = 0,002$), prisutno krvarenje (χ^2 test, $P < 0,001$), značajnije češće im se radila konizacija (χ^2 test, $P = 0,02$) i češće imaju PRVP (χ^2 test, $P < 0,001$) (Tablica 5.).

Tablica 5. Raspodjela ispitanica prema rizičnim čimbenicima i komplikacijama

	Broj (%) ispitanica			P*
	Terminski porod (n = 169)	Prijevremeni porod (n = 175)	Ukupno (n = 344)	
Kava	141 (83,4)	132 (75,4)	273 (79,4)	0,07
Pušenje	42 (24,9)	55 (31,4)	97 (28,2)	0,18
Komplikacije	87 (51,5)	130 (74,3)	217 (63,1)	< 0,001
Uroinfekcija	18 (10,7)	26 (14,9)	44 (12,8)	0,24
Pozitivan CB	38 (22,5)	33 (18,9)	71 (20,6)	0,41
Uzročnik				
Ureaplasma	12 (32,4)	25 (75,8)	37 (52,9)	
Mycoplasma hominis	1 (2,7)	0	1 (1,4)	
Chlamydia	3 (8,1)	1 (3)	4 (5,7)	0,002[†]
Candida	14 (37,8)	9 (9,1)	17 (24,3)	
Trichomonas	7 (18,9)	4 (12,1)	11 (15,7)	
Krvarenje	14 (8,3)	44 (25,1)	58 (16,9)	< 0,001
Konizacija	0	7 (4)	7 (2)	0,02
PRVP	40 (23,7)	103 (59,5)	143 (41,8)	< 0,001

* χ^2 test; [†]Fisherov egzakti test

5. REZULTATI

Učestalost i raspodjela genotipova i alela tri SNP-a u skupinama s ekstra ranim, ranim i kasnim prijevremenim porodom te u terminskom porodu prikazana je u Tablici 6., Tablici 7., Tablici 8., i Tablici 9.

Tablica 6. Učestalost genotipova i alela tri analizirana SNP-a između prijevremenih i terminskih poroda

		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		Prijevremani porod (n = 175)	Terminski porod (n = 169)		
<i>^aTNf – alfa (rs1800629)</i>					
	A/A	8 (5)	2 (1)	4,16 (0,87 – 19,9)	
	G/A	37 (22)	31 (19)	1,24 (0,73 – 2,12)	0,11
	G/G	127 (74)	132 (80)	1	
Alel	G	291 (85)	295 (89)	0,65 (0,41 – 1,03)	0,07
	A	53 (15)	35 (11)		
<i>^bIL – 10 (rs1800896)</i>					
	A/A	56 (32)	53 (32)	1	
	G/A	93 (53)	76 (46)	1,16 (0,71 – 1,88)	0,20
	G/G	25 (14)	35 (21)	0,68 (0,36 – 1,28)	
Alel	G	143 (41)	146 (45)	1,15 (0,85 – 1,56)	0,39
	A	205 (59)	182 (55)		
<i>^cIL – 6 (rs1800796)</i>					
	C/C	1 (1)	0	0	
	G/C	17 (10)	21 (13)	0,75 (0,38 – 1,48)	0,36
	G/G	157 (90)	146 (87)	1	
Alel	C	19 (5)	21 (6)	1,17 (0,62 – 2,22)	0,63
	G	331 (95)	313 (94)		

a - Hardy-Weinberg equilibrium: **prijevremani P = 0,03**; terminski P = 0,70

b - Hardy-Weinberg equilibrium: prijevremeni P = 0,21; terminski P = 0,43

c - Hardy-Weinberg equilibrium: prijevremeni P = 0,40; terminski P > 0,99

* χ^2 test

Tablica 7. Učestalost genotipova i alela tri analizirana SNP-a između ekstra ranih prijevremenih poroda i terminskih poroda

		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		Ekstra rani PP (n = 16)	Terminski porod (n = 169)		
<i>^aTNF – alfa (rs1800629)</i>					
	A/A	0	2 (1)	0	
	G/A	3 (19)	31 (20)	0,98 (0,26 – 3,66)	0,83
	G/G	13 (81)	132 (8)	1	
Alel	G	29 (91)	295 (89)	1,47 (0,33 – 3,9)	0,83
	A	3 (9)	35 (11)		
<i>^bIL – 10 (rs1800896)</i>					
	A/A	5 (31)	53 (32)	1	
	G/A	6 (38)	76 (45)	0,84 (0,24 – 2,88)	0,65
	G/G	5 (31)	35 (21)	1,51 (0,41 – 5,62)	
Alel	G	16 (50)	146 (45)	0,80 (0,39 – 1,66)	0,55
	A	16 (50)	182 (55)		
<i>^cIL – 6 (rs1800796)</i>					
	C/C	0	0	-	
	G/C	1 (6)	21 (11)	0,46 (0,06 – 3,69)	0,42
	G/G	15 (94)	146 (88)	1	
Alel	C	1 (3)	21 (6)	2,1 (0,27 – 15,9)	0,48
	G	31 (97)	313 (94)		

a - Hardy-Weinberg equilibrium: ekstra rani P = 0,91; terminski P = 0,70

b - Hardy-Weinberg equilibrium: ekstra rani P = 0,34; terminski P = 0,43

c - Hardy-Weinberg equilibrium: ekstra rani P > 0,99; terminski P > 0,99

*χ² test

Tablica 8. Učestalost genotipova i alela tri analizirana SNP-a između ranih prijevremenih poroda i terminskih poroda

		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		Rani PP (n = 27)	Terminski porod (n = 169)		
<i>^aTNF – alfa (rs1800629)</i>					
	A/A	0	2 (1)	0	
	G/A	5 (19)	31 (19)	0,97 (0,34 – 2,76)	0,74
	G/G	22 (81)	132 (80)	1	
Alel	G	49 (91)	295 (89)	1,16 (0,43 – 3,1)	0,76
	A	5 (9)	35 (11)		
<i>^bIL – 10 (rs1800896)</i>					
	A/A	9 (35)	53 (32)	1	
	G/A	16 (62)	76 (46)	1,24 (0,51 – 3,02)	0,05
	G/G	1 (4)	35 (21)	0,17 (0,02 – 1,39)	
Alel	G	18 (35)	146 (45)	1,52 (0,82 – 2,79)	0,18
	A	34 (65)	182 (55)		
<i>^cIL – 6 (rs1800796)</i>					
	C/C	0	0	0	
	G/C	3 (11)	21 (13)	0,87 (0,24 – 3,14)	0,83
	G/G	24 (89)	146 (87)	1	
Alel	C	3 (6)	21 (6)	1,14 (0,33 – 3,96)	0,84
	G	51 (94)	313 (94)		

a - Hardy-Weinberg equilibrium: rani P > 0,99; terminski P = 0,70

b - Hardy-Weinberg equilibrium: rani P = 0,19; terminski P > 0,99

c - Hardy-Weinberg equilibrium: rani P > 0,99; terminski P > 0,99

* χ^2 test

Tablica 9. Učestalost genotipova i alela tri analizirana SNP-a između kasnih prijevremenih poroda i terminskih poroda

		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		Kasni PP (n = 132)	Terminski porod (n = 141)		
<i>^aTNF – alfa (rs1800629)</i>					
	A/A	8 (6)	2 (1)	5,74 (1,19 – 27,65)	
	G/A	29 (22)	31 (19)	1,34 (0,76 – 2,38)	0,04
	G/G	92 (71)	132 (80)	1	
Alel	G	213 (83)	295 (89)	0,56 (0,35 – 0,90)	0,02
	A	45 (17)	35 (11)		
<i>^bIL – 10 (rs1800896)</i>					
	A/A	42 (32)	53 (32)	1	
	A/G	71 (54)	76 (46)	1,18 (0,70 – 1,98)	0,25
	G/G	19 (14)	35 (21)	0,69 (0,34 – 1,37)	
Alel	G	109 (41)	146 (45)	1,14 (0,82 – 1,58)	0,43
	A	155 (59)	182 (55)		
<i>^cIL – 6 (rs1800796)</i>					
	C/C	1 (1)	0	0	
	G/C	13 (10)	21 (13)	0,77 (0,37 – 1,59)	0,34
	G/G	118 (89)	146 (87)	1	
Alel	C	15 (6)	21 (6)	1,11 (0,56 – 2,21)	0,76
	G	249 (94)	313 (94)		

a - Hardy-Weinberg equilibrium: **kasni P = 0,03**; terminski P = 0,70

b - Hardy-Weinberg equilibrium: kasni P = 0,28; terminski P = 0,67

c - Hardy-Weinberg equilibrium: kasni P = 0,34; terminski P > 0,99

* χ^2 test

6. RASPRAVA

Prijevreteni porod vodeći je uzrok neonatalnog mortaliteta i morbiditeta te je glavni faktor rizika za razvoj neuroloških oštećenja (34). Unatoč brojnim istraživanjima i preventivskim mjerama stopa prijevretenih poroda u svijetu se ne smanjuje (2).

Prijevreteni porod može biti posljedica brojnih čimbenika. Dvije najznačajnije etiologije su jatrogeni i spontani prijevreteni porod. Medicinski inducirani prijevreteni porod, čiji su uzroci preeklampsija, eklampsija te intrauterini zastoj u rastu, čini od 30 do 40 % svih prijevretenih poroda. Spontani prijevreteni porod čini ostatak postotka. Etiologija spontanog prijevretenog poroda vrlo je kompleksna te može biti uzrokovana brojnim čimbenicima poput infekcije, upale, krvarenjem, sociodemografskim te genetičkim čimbenicima (34, 35). Genetički čimbenici postaju sve veći interes istraživača pri otkrivanju uzroka idiopatskog prijevretenog poroda te je dokazano kako je veća stopa prijevretenih poroda u trudnica koje su već imale prijevreteni porod ili je on zabilježen u obiteljskoj anamnezi (36).

Poznato je kako brojni citokini igraju bitnu ulogu u trudnoći i održavanju iste. TNF-alfa proupalni je citokin koji djeluje preko TNF receptora eksprimiranih na većini stanica imunološkog sustava. Osim svoje ključne uloge u upalnim odgovorima protiv infekcije, TNF-alfa važan je regulator normalnog funkcioniranja stanica, utječući na vitalne biološke procese poput proliferacije stanica, apoptoze i proizvodnje drugih citokina. Apoptoza je ključan proces za regulaciju preživljavanja stanica trofoblasta placente u normalnoj trudnoći (37). U zdravoj su trudnoći serumske vrijednosti TNF-alfa u drugom i trećem tromjesečju znatno više u usporedbi s prvim (37, 38). Druga istraživanja pokazuju smanjenje serumske razine TNF-alfa ili da do promjene nije ni došlo (37).

IL-6 pleiotropan je citokin kojega većinski proizvode monociti i makrofagi, ali također i druge imunološke i neimune stanice poput endotelnih stanica. IL-6 posreduje u implantaciji embrija i razvoju placente (37). U zdravih trudnoća, serumska razina IL-6 mnogostruko se povećava (39).

IL-10 protuupalni je citokin kojega proizvode makrofagi, mastociti, Th2 stanice i T regulatorne stanice. IL-10 ima mogućnost inhibicije proupalnih citokina, a zbog svojih imunomodulacijskih svojstava kontroliraju upalu što je izrazito bitno za uspješnu trudnoću (37). Serumska koncentracija IL-10 progresijom trudnoće se smanjuje. U prvom tromjesečju je najviša

te počinje opadati do trećeg tromjesečja iako razlike s početka i kraja trudnoće nisu velike (40, 41). Nayak i suradnici 2016. godine ukazali su na značajan pad serumske koncentracije IL-10 između prvog i trećeg tromjesečja (42).

S obzirom na važnost ova triju citokina u održavanju trudnoće, odlučio sam ispitati imaju li polimorfizmi jednog nukleotida utjecaj na pojavnost prijevremenog poroda. Ispitivani su SNP-ovi za *TNF-alfa* (rs1800629), *IL-10* (rs1800896) i *IL-6* (rs1800796) ne bi li se dokazala djelomična povezanost s većim ishodom za prijevremeni porod u trudnica s polimorfizmom naspram onih bez polimorfizma.

Uz analizu SNP-ova, u svrhu istraživanja, uzeta je i anamneza trudnica. Iz anamneze je poznato da trudnice koje su imale prijevremeni porod značajnije češće imaju pozitivan cervikalni bris na ureaplazmu. Sprong i suradnici su 2020. ukazali kako kolonizacija ureaplazmom ima nepovoljne ishode na trudnoću poput prijevremenog poroda ili mrtvorođenja (43).

Značajno povećan rizik za pojavnost ranog i ekstra ranog prijevremenog poroda uslijed infekcije ureaplazmom naspram trudnica s negativnim brisom na ureaplazmu dokazali su 2019. godine Rittenschober – Böhm i suradnici u istraživanju provedenom na 1247 ispitanice i 1969 pripadajuće kontrole (44).

Također, trudnice koje su prijevremeno rodile značajno češće su bile podvrgnute konizaciji u usporedbi s kontrolnom skupinom. Konizacija podrazumijeva kirurško otklanjanje u kojemu se otklanja dio tkiva vrata maternice koji je suspektan na pojavnost cervikalne displazije. Operacija se izvodi pod općom anestezijom te se dio vrata maternice izreže u obliku konusa. Dubina i širina konusa određuju se prema životnoj dobi i želji za daljnjim rađanjem (45). Firichenko i suradnici ustanovili su poveznicu između povećanog rizika za pojavnost prijevremenog poroda i konizacije. Rizik za prijevremeni porod značajno je porastao u žena s kraćim cerviksom u usporedbi s kontrolnom skupinom s normalnim cerviksom (46).

Trudnice koje su prijevremeno rodile značajno su češće krvarile tijekom trudnoće. Salim i suradnici 2019. proveli su istraživanje kako bi provjerili utjecaj progesteronske terapije na smanjenje rizika za pojavnost prijevremenog poroda u žena koje su krvarile u drugom i trećem tromjesečju te su ukazali kako ne postoji statistički značajna razlika u pojavnosti prijevremenog poroda u ispitanica i kontrola (47). Prijašnja istraživanja dokazala su kako žene koje krvare tijekom trudnoće imaju tri puta veći rizik za pojavnost prijevremenog poroda (48). Pojava krvarenja u

drugom tromjesečju predstavlja povećan rizik za razvoj prijevremenog poroda navode 2000. Parant i suradnici (49).

Prerano prijevremeno prsnuće plodovih ovoja (PPROM, engl. Preterm premature rupture of the membranes) značajno je učestalije u trudnica s prijevremenim porodom u usporedbi s pripadajućim kontrolama. PPRROM združen je s 40 % prijevremenih poroda (50). Ishod preranog prijevremenog prsnuća vodenjaka usko je povezan s prijevremenim porodom te oni dijele faktore rizika poput sociodemografskih i okolišnih čimbenika (51).

Varijacije gena poput polimorfizma jednog nukleotida mogu imati utjecaj na transkripciju, na poluživot RNA te na samu funkciju proteina. Najčešće proučavani SNP-ovi su oni povezani s upalnim reakcijama majke (2). Učestalost i raspodjela alela ovog istraživanja u skladu su s alelnom frekvencijom Europe (52, 53, 54).

U svrhu studije analizirana su tri SNP-a (rs1800629, rs1800896 i rs1800796) kako bi se ustanovilo jesu li navedeni polimorfizmi rizični faktori za razvoj prijevremenog poroda. Rezultati analize genotipova i alela za tri navedena SNP-a prijevremenih poroda uspoređivana je s terminskim porodima te nije nađena statistički značajna razlika između raspodjele genotipova i alela između ispitivane i kontrolne skupine. Kada su rezultati prijevremenih poroda raspodijeljeni na stadije kasni, rani i ekstra rani prijevremeni porod te uspoređeni s kontrolnom skupinom došlo je do statistički značajne razlike u rezultatima.

Uspoređujući rezultate kasnog prijevremenog poroda s terminskim porodima ustanovljena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela za *TNF-alfa*. Genotip A/A predstavlja 5,5 puta veći rizik za razvoj prijevremenog poroda u usporedbi s genotipom G/G. Coucerio i suradnici 2021. godine ukazali su na to da polimorfizam rs1800629 za *TNF-alfa* predstavlja rizični čimbenik za pojavu prijevremenog poroda (55).

Studija koju su 2016. godine proveli Andaras i suradnici pokazala je kako polimorfizam u genu za *TNF-alfa* sam nema značajnu razliku u pojavnosti prijevremenog poroda te da također nema bitne razlike u raspodjeli genotipova i alela između trudnica koje su rodile prijevremeno i onih koje su rodile terminski (56).

Trudnice koje imaju genotip A/A imaju veću šansu za razvoj prijevremenog poroda nego trudnice s drugim genotipovima s obzirom da polimorfizam -308A rezultira pojačanom ekspresijom citokina. Povišene razine TNF-alfa povezane su s većom pojavnosti prijevremenih

poroda s obzirom da je odgovor tijela na upalu pojačan, a upalni procesi mogu potaknuti prijevremeni porod (57).

Belusova i suradnici 2019. godine proveli su istraživanje na 106 trudnica i ustanovili kako su uz polimorfizam -308A polimorfizmi -237 G > A, -307 G > A, -857 C > T, -863 C > T, -1032 T > C, -283 G > A, -851 G > A, -323 G > A, +691 G > A i -376 G > A povezani s većom stopom prijevremenih poroda. Također, rad je prikazao kako je genotip A/A za -308 G > A češći u žena koje imaju prijevremeni porod. 3,8 puta je alel A češći u žena s prijevremenim porodom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Unatoč svim navodima, zbog nedostatka značajne razlike između ispitivane i kontrolne skupine, alel A u -308 G > A ne može se razmotriti kao čimbenik rizika vrlo ranog i ranog prijevremenog poroda (58).

Mogući potencijal za protektivan učinak alela -308A za *TNF-alfa* u afro-amerikanaca pokazali su u svojim istraživanjima 2011. Jones i suradnici (59) te Ribeiro de Andrade Ramos i suradnici 2016. godine (60).

Uspoređujući rezultate analize SNP-ova prema modelima nasljeđivanja nema statistički značajne razlike između prijevremenih poroda i terminskih poroda, no rezultati SNP analize ranih prijevremenih poroda ukazuju da IL-10 posjeduje potencijalni protektivni čimbenik u slučaju recesivnog modela nasljeđivanja (G/G – A/G, A/A) koji smanjuje rizik pojave ranog prijevremenog poroda za 6,5 puta.

2022. godine Cao i suradnici istraživali su povezanost polimorfizma *IL-10* -1082 A > G (rs1800896) s prijevremenim porodom te je u istraživanje uključeno 11 studija. Superdominantni model AA + GG pokazao je značajnu povezanost s prijevremenim porodom naspram AG modela nasljeđivanja. Superdominantni model nasljeđivanja imao je protektivan učinak na pojavnost prijevremenog poroda. Potencijalna značajna povezanost između polimorfizma i prijevremenog poroda pronađena je za alel G naspram alela A (61).

U istraživanju slučajeva i kontrola provedenom 2011. godine Menon i suradnici nisu pronašli statistički značajnu povezanost polimorfizma -1082 A > G u bijele rase (62).

Pandey i suradnici proveli su istraživanje na 1118 trudnica te su utvrdili da postoji statistički značajna povezanost polimorfizma za *IL-10* (rs1800896) s prijevremenim porodom te su utvrdili kako trudnice s navedenim polimorfizmom imaju niže serumske koncentracije IL-10 naspram kontrola (63).

Na uzorku indonezijske populacije Andalas i suradnici u istraživanju provedenom 2017. godine nisu uspjeli pronaći statistički značajnu povezanost polimorfizma -1082 A > G s prijevremenim porodom te utjecaj navedenog polimorfizma na serumsku koncentraciju IL-10 (64). Liubomyrska i suradnici 2018. godine utvrdili su kako polimorfizam -1082 A > G sam nema poveznicu s preranim prijevremenim prsnućem vodenjaka i prijevremenim porodom, no u sinergiji s polimorfizmima *IL-4* i *RLN2* (relaksin 2) može utjecati na ishod trudnoće (65).

Ribeiro de Andrade Ramos i suradnici 2016. godine došli su do zaključka da prisutnost polimorfizma *IL-10* -1082 A > G predstavlja potencijalni rizični čimbenik za prijevremeni porod (60).

IL-10 igra ključnu ulogu u indukciji normalnog poroda. Povećana regulacija ovog protuupalnog citokina dovodi do supresije NK stanica i T limfocita protiv fetalnih aloantigena. Genske varijacije unutar gena za *IL-10* mogle bi imati utjecaj na ishod trudnoće te je promjena u ekspresiji *IL-10* povezana s povećanom incidencijom komplikacija. *IL-10* ima mogućnost smanjiti patološke učinke upale koji prevladavaju u prijevremenih poroda. Iz toga se da zaključiti kako je ekspresija *IL-10* tijekom trudnoće oprezno regulirana (66).

Rezultati SNP analize za *IL-6* nisu ni u jednoj raspodjeli pokazali statistički značajnu razliku.

Studija koju su proveli Han i suradnici 2020. godine na korejskoj populaciji pokazala je da postoji statistički značajna povezanost polimorfizma rs1800796 za *IL-6* i prijevremeni porod (67). Istraživanje provedeno na trudnicama iz Japana ukazala je da postoji poveznica između trudnica koje nose C alel za *IL-6* -572 i pojavu prijevremenog poroda. Polimorfizam utječe na pojačanu proizvodnju *IL-6* što bi moglo imati utjecaja na prijevremeni porod (68).

2023. godine Kwon i suradnici proveli su studiju na populaciji Južne Koreje te su došli do zaključka da polimorfizam u promotorskoj regiji *IL-6* na lokaciji -572 rezultira abnormalnom funkcijom proteina koji za posljedicu može imati brojne nuspojave, uključujući prijevremeni porod (69).

Velez i suradnici 2008. godine ukazali su da polimorfizam na lokaciji -572 za *IL-6* ima potencijalno protektivan utjecaj u svezi s prijevremenim porodom (70).

7. ZAKLJUČAK

Sukladno rezultatima ovog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Ne postoji statistički značajna razlika prilikom usporedbe raspodjele alela i genotipova ispitivanih SNP-ova za gene *IL-6*, *IL-10* i *TNF-alfa* u prijevremenih i terminskih poroda.
2. Statistički značajna razlika utvrđena je pri usporedbi alela i genotipova skupine trudnica kasnih prijevremenih poroda i terminskih poroda za SNP za *TNF-alfa* (rs1800629). Genotip A/A predstavlja 5,5 puta veći rizik za pojavnost prijevremenog poroda nego genotip G/G.
3. Majke nositeljice A/A i/ili G/G genotipa SNP-a rs1800896 za *IL-10* u recesivnom (G/G vrs A/G+A/A) modelu nasljeđivanja imaju potencijalni protektivan utjecaj polimorfizma koji smanjuje pojavnost prijevremenog poroda za 6,5 puta.
4. Analiza SNP-a *IL-6* (rs1800796) niti u jednoj raspodjeli nije dala statistički značajnu razliku.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu ispitati povezanost 3 genske varijante *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) i *TNF-alfa* (rs1800629) s pojavom spontanijh prijevremenih poroda te utvrditi jesu li navedene varijante genetički rizični čimbenici.

USTROJ STUDIJE. Studija slučajeva i kontrola.

MATERIJALI I METODE. Analizirano je 175 uzoraka trudnica koje su prijevremeno rodile i 169 pripadajućih kontrolnih uzoraka radi genotipizacije s ciljem određivanja varijanti gena za *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) i *TNF-alfa* (rs1800629). Kontrolni uzorci su uzorci trudnica s terminskim porodom. Izolacija DNA vršila se na mini spin kolonama, NucleoSpin Blood, prema protokolu proizvođača. Kvaliteta i čistoća izolirane DNA ispitala se fluorometrom Qubit 3 Fluorometer. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu na uređaju Applied Biosystem 7500 Real time PCR system određene su varijante gena za *IL-6*, *IL-10* i *TNF-alfa* u trudnica s prijevremenim porodom u odnosu na trudnice koje su iznijele trudnoću do kraja gestacijskog perioda. Programskim paketom 7500 Software v2.3. analizirani su dobiveni genotipovi.

REZULTATI. Nositeljice A/A genotipa za rs1800629 imaju 5,5 puta veću šansu za pojavnost kasnog prijevremenog poroda. Prisutnost A/A ili A/G genotipa za rs1800896 u recesivnom modelu nasljeđivanja predstavlja potencijalno protektivan utjecaj u kojemu ispitanice imaju 6,5 puta manju mogućnost prijevremenog poroda. U ovom istraživanju nije ustanovljena poveznica između *IL-6* i pojavnosti prijevremenog poroda.

ZAKLJUČAK. Rs1800629 u majke povezan je s prijevremenim porodom. Rs1800896 pokazuje potencijalno protektivan utjecaj za pojavnost prijevremenog poroda. U ovom istraživanju nije ustanovljena poveznica između prijevremenog poroda i rs1800796.

KLJUČNE RIJEČI: IL-6, IL-10, prijevremeni porod, polimorfizam jednog nukleotida (SNP), *TNF-alfa*

9. SUMMARY

The role of gene variants for *IL-6*, *IL-10* and *TNF-alpha* in the incidence of preterm birth

OBJECTIVES. The association of gene variants for *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) and *TNF-alpha* (rs1800629) with the occurrence of spontaneous preterm birth was examined using the real time polymerase chain method to determine whether these genetic variations are a risk factor or not.

STUDY DESIGN. Case-control study.

MATERIALS AND METHODS. 175 samples of pregnant women who gave birth prematurely and 169 corresponding control samples were analyzed for genotyping with the aim of determining gene variants for *IL-6* (rs1800796), *IL-10* (rs1800896) and *TNF-alpha* (rs1800629). Control samples are samples of pregnant women with term delivery. DNA isolation was performed on mini spin columns, NucleoSpin Blood, according to the manufacturer's protocol. The quality and purity of the isolated DNA was tested with a Qubit 3 Fluorometer. The gene variants for *IL-6*, *IL-10* and *TNF-alpha* were determined in pregnant women with premature birth compared to pregnant women who carried the pregnancy to the end of the gestational period using the polymerase chain reaction method in real time on the Applied Biosystem 7500 Real time PCR system. With the program package 7500 Software v2.3. the obtained genotypes were analyzed.

RESULTS. Carriers of the A/A genotype for rs1800629 have a 5.5 times greater chance of late preterm birth. The presence of the A/A or A/G genotype for rs1800896 in the recessive model of inheritance represents a potentially protective influence in which the test subjects have a 6.5 times lower chance of premature birth. This study did not establish a link between *IL-6* and the incidence of premature birth.

CONCLUSION. Rs1800629 in mothers is associated with preterm birth. Rs1800896 shows a potentially protective effect for the incidence of preterm birth. In this study, no link was established

between premature birth and rs1800796.

KEY WORDS: IL-6, IL-10, preterm birth, single nucleotide polymorphism (SNP), TNF-alpha

10. LITERATURA

1. Grgić G, Ljuca D, Bogdanović G, Halilović E, Hodžić M. Prijevremeni porod. *Acta Medica Saliniana*. 2017;47:32-8.
2. Kadivnik M. Polimorfizmi gena za progesteronski receptor u modulaciji rizika idiopatskog spontanog prijevremenog poroda. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2022.
3. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, et al. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. 2013;10:S2.
4. Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *BJOG*. 2005;112:28–31.
5. Monangi NK, Brockway HM, House M, Zhang G, Muglia LJ. The genetics of preterm birth: Progress and promise. *Semin Perinatol*. 2015;39:574–83.
6. Plunkett J, Muglia LJ. Genetic contributions to preterm birth: Implications from epidemiological and genetic association studies. *Ann Med*. 2008;40:167–79.
7. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. Feero WG, Guttmacher AE, editors. *NEJM*. 2010;363:166–76.
8. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. *JAMA*. 2014;312:1880.
9. Pandey M, Chauhan M, Awasthi S. Interplay of cytokines in preterm birth. *IJMR*. 2017;146:316–27.
10. Howell MW. Interleukin-10 Gene Polymorphisms and Cancer. 2013. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6117/>. Datum pristupa: 27.5.2023.
11. Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R. Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2006;55:130–5.
12. Stonek F, M. Metzenbauer, Hafner E, Philipp K, Tempfer CB. Interleukin-10 –1082 G/A promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1,616 pregnant women. 2008; Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18382869/>. Datum pristupa: 28.5.2023.

13. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochemia Med.* 2015;25:36–48.
14. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol.* 2020;33:127–48.
15. Simhan HN, Krohn MA, Roberts JM, Zeevi A, Caritis SN. Interleukin-6 promoter –174 polymorphism and spontaneous preterm birth. 2003;189:915–8.
16. Velez DR, Menon R, Thorsen P, Jiang L, Simhan H, Morgan N, et al. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Ann Hum Genet.* 2007;71:586–600.
17. Yang X, Peng W, Zhu LN, Zhang XA, Wang Y. Association between IL-6 C-572G and susceptibility to spontaneous preterm birth. *Chin J Contemp Pediatr.* 2017;19:806–11.
18. Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BCJM. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II--endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2008;15:97–118.
19. Chen B, Li H. Association of IL-6 174G/C (rs1800795) and 572C/G (rs1800796) polymorphisms with risk of osteoporosis: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020;21:330-342.
20. Qi HP, Qu ZY, Duan SR, Wei SQ, Wen SR, Bi S. IL-6-174 G/C and -572 C/G Polymorphisms and Risk of Alzheimer's Disease. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037858>. Datum pristupa: 5.6.2023.
21. Li L, Li E, Zhang LH, Jian LG, Liu HP, Wang T. IL-6-174G/C and IL-6-572C/G polymorphisms are associated with increased risk of coronary artery disease. *GMR.* 2015;14:8451–7.
22. Soo Ngee Koh, Jang Y, Yae Jung Hyun, Park JH, Young Min Song, Kyung Hwan Shin, et al. Interleukin-6 (*IL-6*) -572C→G promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes risk in Koreans. 2009. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03315.x>. Datum pristupa: 5.6.2023.
23. Mahdavi Sharif P, Jabbari P, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. Importance of TNF-alpha and its alterations in the development of cancers. *Cytokine.* 2020;130:155066.

24. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, et al. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *AJOG*. 1999;180(5):1297–302.
25. Monzón-Bordonaba F, Vadillo-Ortega F, Feinberg RF. Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor- α : A role in pregnancy establishment and maintenance. 2002. Dostupno na: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(02\)00473-8/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(02)00473-8/fulltext). Datum pristupa: 10.6.2023.
26. Shi L, Zhang L, Zhang D, Zhou J, Jiang X, Jin Y, et al. Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2020; 56:226-235.
27. Yang G, Chen J, Xu F, Bao Z, Yao Y, Zhou J. Association between Tumor Necrosis Factor- α rs1800629 Polymorphism and Risk of Asthma: A Meta-Analysis. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099962>. Datum pristupa: 10.6.2023.
28. Crider KS, Whitehead N, Buus RM. Genetic variation associated with preterm birth: A HuGE review. *Genet Med*. 2005;7:593–604.
29. Bioanalysis Macherey-Nagel User manual. 2022. Dostupno na: <https://www.mn-net.com/media/pdf/37/74/03/Instruction-NucleoSpin-Blood-L-XL-QuickPure.pdf>. Datum pristupa: 4.7.2023.
30. Thermo Fisher Scientific. Qubit 4 Assay Quick Reference. 2021. Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017210_Qubit_4_Assays_QR.pdf. Datum pristupa: 4.7.2023.
31. Thermo Fisher Scientific. Qubit 3 Fluorometer manual. 2021. Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0010866_Qubit_3_Fluorometer_UG.pdf. Datum pristupa: 2.7.2023.
32. Thermo Fisher Scientific. Real-Time PCR handbook. 2014. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. Datum pristupa: 2.7.2023.

33. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006. Dostupno na: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/15/1928/242938>. Datum pristupa: 3.7.2023.
34. Chen X, Zhang X, Li W, Li W, Wang Y, Zhang S, et al. Iatrogenic vs. Spontaneous Preterm Birth: A Retrospective Study of Neonatal Outcome Among Very Preterm Infants. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389%2Ffneur.2021.649749>. Datum pristupa: 10.6.2023.
35. Bhattacharjee E, Maitra A. Spontaneous preterm birth: the underpinnings in the maternal and fetal genomes. Dostupno na <https://www.nature.com/articles/s41525-021-00209-5>. Datum pristupa: 10.6.2023.
36. Berger R, Rath W, Abele H, Garnier Y, Kuon Ruben-J, Maul H. Reducing the risk of preterm birth by ambulatory risk factor management. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2019. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6970314/>. Datum pristupa: 11.8.2023.
37. Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. Zakar T, editor. *Journal of Pregnancy*. 2021. Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/jp/2021/6649608/>. Datum pristupa: 11.8.2023.
38. Lindsay K, Buss C, Wadhwa P, Entringer S. Maternal Stress Potentiates the Effect of an Inflammatory Diet in Pregnancy on Maternal Concentrations of Tumor Necrosis Factor Alpha. *Nutrients*. 2018;10(9):1252.
39. Scholaske L, Buss C, Wadhwa PD, Entringer S. Acculturation and interleukin (IL)-6 concentrations across pregnancy among Mexican-American women. *Brain Behav Immun*. 2018;73:731–5.
40. Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *J Pregnancy*. 2021;2021:1–33.

41. Stokkeland LMT, Giskeødegård GF, Stridsklev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangerås LH, et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. *Cytokine*. 2019;119:188–96.
42. Nayak M, Peinhaupt M, Heinemann A, Eekhoff MEW, van Mechelen W, Desoye G, et al. Sedentary behavior in obese pregnant women is associated with inflammatory markers and lipid profile but not with glucose metabolism. *Cytokine*. 2016;88:91–8.
43. Sprong KE, Mabenge M, Wright CA, Govender S. Ureaplasma species and preterm birth: current perspectives. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46:169–81.
44. Rittenschober-Böhm J, Waldhoer T, Schulz SM, Pimpel B, Goeral K, Kasper DC, et al. Vaginal Ureaplasma parvum serovars and spontaneous preterm birth. *AJOG*. 2019;220:594.–9.
45. Topolovec Z. Konizacija vrata maternice / Konusna biopsija vrata maternice. Osijek: Klinički bolnički centar Osijek, Zavod za ginekološku onkologiju s intenzivnim liječenjem, Klinika za ginekologiju i opstetriciju. 2021. Dostupno na: <https://www.kbco.hr/wp-content/uploads/2021/06/konizacija.pdf>. Datum pristupa: 11.8.2023.
46. Firichenko SV, Stark M, Mynbaev OA. The impact of cervical conization size with subsequent cervical length changes on preterm birth rates in asymptomatic singleton pregnancies. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8492699/>. Datum pristupa: 11.8.2023.
47. Salim R, Hakim M, Zafran N, Nachum Z, Romano S, Garmi G. Double-blind randomized trial of progesterone to prevent preterm birth in second-trimester bleeding. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019;98:1318–25.
48. Sipilä P, Hartikainen-Sorri AL, Oja H, Von Wendt L. Perinatal outcome of pregnancies complicated by vaginal bleeding. *BJOG*. 1992;99:959–63.
49. Parant O, Clouet-Delannoy M, Connan L, Duclusaud A, Chale J, Fournié A. Metrorrhagia during the second trimester of pregnancy: obstetrical and perinatal outcome. A retrospective study including 85 cases. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2000;29:66–72.

50. Škrablin-Kučić S. SMJERNICE ZA PRERANO PRIJEVREMENO PRSNUĆE VODENJAKA (PRVP) Royal College of Obstetrics and Gynaecology. *Gynaecol Perinatol.* 2009;18:132–9.
51. Bouvier D, Forest JC, Blanchon L, Bujold E, Pereira B, Bernard N, et al. Risk Factors and Outcomes of Preterm Premature Rupture of Membranes in a Cohort of 6968 Pregnant Women Prospectively Recruited. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912547/>. Datum pristupa: 11.8.2023.
52. Thermo Fisher Scientific. [C___7514879_10] [LOC100287329]. Thermofisher.com. 2023. Dostupno na: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___7514879_10?CID=&ICID=&subtype=. Datum pristupa: 11.8.2023.
53. Thermo Fisher Scientific. [C___1747360_10] [IL10]. Thermofisher.com. 2023. Dostupno na: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___1747360_10#assay-details-section. Datum pristupa: 11.8.2023.
54. Thermo Fisher Scientific. [C__11326893_10] [IL6]. Thermofisher.com. 2023. Dostupno na: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__11326893_10?CID=&ICID=&subtype=. Datum pristupa: 11.8.2023.
55. Couceiro J, Matos I, Mendes JJ, Baptista PV, Fernandes AR, Quintas A. Inflammatory factors, genetic variants and predisposition for preterm birth. *Clin Genet.* 2021;100:357–67.
56. Andalas M, Hakimi M, Nurdiati DS, Astuti I, Imran I, Harapan H. Association of 308G/A TNF- α gene polymorphism and spontaneous preterm birth in Acehese ethnic group, Indonesia: This polymorphism is not associated with preterm birth. *Egypt J Med Hum Genet.* 2016;17:33–40.

57. Awasthi S, Pandey M, Sundaram V, Dixit P. Association of TNF- α and IL-1 β gene Polymorphisms with Preterm Birth-Replication Study and Meta Analysis. ResearchGate. 2014. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/290427470_Association_of_TNF-a_and_IL-1_b_gene_Polymorphisms_with_Preterm_Birth-Replication_Study_and_Meta_Analysis. Datum pristupa: 12.8.2023.
58. Belousova VS, Svitich OA, Timokhina E, A.N. Strizhakov, I.M. Bogomazova. Polymorphism of the IL-1 β , TNF, IL-1RA and IL-4 Cytokine Genes Significantly Increases the Risk of Preterm Birth. *Biokhimiya*. 2019;84:1040–6.
59. Jones NM, Holzman C, Tian Y, Witkin SS, Mehmet Genç, Friderici KH, et al. Innate immune system gene polymorphisms in maternal and child genotype and risk of preterm delivery. *J Matern-fetal Neonatal Med*. 2011;25:240–7.
60. Ribeiro B, Mendes ND, Aline Aki Tanikawa, Antônio M, Santos S, et al. Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. 2016. Dostupno na: <https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-016-0823-1>. Datum pristupa: 14.8.2023.
61. Cao XL, Zhou XY, Xu NX, Chen SC, Xu CM. Association of IL-4 and IL-10 Polymorphisms With Preterm Birth Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35860261/>. Datum pristupa: 12.8.2023.
62. Menon R, Fortunato SJ, Velez Edwards DR, Williams SM. Association of Genetic Variants, Ethnicity and Preterm Birth with Amniotic Fluid Cytokine Concentrations. *Ann Hum Genet*. 2010;74:165–83
63. Pandey M, Awasthi S, Singh U, Mahdi AA. Association of IL-10 Gene Polymorphism (–819C > T, –592C > A and –1082G > A) with Preterm Birth. *IJP*. 2017;85:93–101.

64. Andalas M, Hakimi M, Nurdiati DS, Astuti I, Ichsan I, Wahyuniati N, et al. Lack of association between the -1082 (A/G) IL-10 polymorphism (rs1800896) and spontaneous preterm birth in the Indonesian Acehnese population. *Pol Ann Med.* 2017;24:209–13.
65. Liubomyrska KS, Kamyshnyi OM, Krut YY et al. Association between single nucleotide polymorphism of immunoregulatory genes and preterm premature rupture of membranes in preterm labour. *dspace.zsmueduu.* 2018; Dostupno na: <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/8438>. Datum pristupa: 15.8.2023.
66. Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, Zare-Bidaki M, Pourtalebi S, Arababadi MK. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19:119–24.
67. Han SH, Lee NR, Kim HJ, Kang YD, Kim JS, Park JW, et al. Association between the IL-6, IL-10, and TNF α gene polymorphisms and preterm-birth in Korean women. *Genes Genom.* 2020;42:743–50.
68. Sugita N, Kobayashi T, Kikuchi A, Shimada Y, Hirano E, Sasahara J, et al. Immunoregulatory gene polymorphisms in Japanese women with preterm births and periodontitis. 2012; Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22382006/>. Datum pristupa: 15.8.2023.
69. Kwon MJ, Kim JH, Kim KJ, Ko EJ, Lee JY, Ryu CS, et al. Genetic Association between Inflammatory-Related Polymorphism in STAT3, IL-1 β , IL-6, TNF- α and Idiopathic Recurrent Implantation Failure. *Genes.* 2023;14:1588.
70. Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet* 2008;17:1619–30.

11. ŽIVOTOPIS

Deni Plečko, student 2. godine sveučilišnog diplomskog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Osobni podatci:

Datum i mjesto rođenja: 09.04.1999., Osijek

Adresa stanovanja: Antuna Matije Reljkovića 5, 31550, Valpovo

E-mail: deni.plecko@gmail.com/dplecko@mefos.hr

Telefon: 099/324-0070

Školovanje:

2006. – 2014. Osnovna škola Matija Petar Katančić, Valpovo

2014. – 2018. Srednja škola Valpovo, Opća gimnazija

2018. – 2021. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2021. – 2023. Medicinski fakultet Osijek, sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Osobne vještine:

Hrvatski jezik – materinji

Strani jezik – engleski